华 25 (19) 日本国特許庁 (JP)

(B2) 퐾 4 盐

(11)特許番号

(45)発行日 平成9年(1997)9月3日

第2649287号

(24) 登録日 平成9年(1997) 5月16日

\$ 2/00 A 0 1 H C12N 广内监理器导

10月紀中

\$ 2/10

C12N A01H (51) Inta.

技術表示循所

ပ

謝求項の数13(全 13 頁)

	日本たはこ産業保護会社 東京都能区成ノ門2丁目2年1号	5 紹江井 枯弘 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たば	C 医蒙林式会社建位有错研究所内 6 小醫 數錄	静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たば	ご 企業株式会社遺伝育機研究所内計理士 各川 英次郎	要 三點	> 走り口袋屋
(73) 徐祚権者		(72) 完明者	(72) 発明者		(74) (CII A	黎	
特别平 6—503169	平成5年(1983)7月6日	PCT/1P93/00926	WO94/00977 平成6年(1994)1月20日	特配平4 -204484	平4 (1882) 7 月 7 日 日本 (J P)		
(21) 田國聯合	(86) (22) (11年日	(86) 国際出版条号	(87) 因際公開番号(87) 国際公開日	(31) 優先指主張森马	(32)優先相主張原		

(54) 【発明の名称】 洋子棋植物の形質振復方法

37 【特許請求の範囲】

[請求項1] 所望の遺伝子を含有するアグロバクテリウ **以分化した特姿組織を形質転換することから成る単子薬** 4周相的で単子葉植物の既分化過程にある培養組織又は 直物の形質を換方法。

【開求項2】前記単子萊植物がイネ科植物である開求項

[制永項3] 前記単子葉植物がイネである精永項1 記載 記載の方法。

[請求囚4] 何記の単子禁植物がトウモロコンである蹟

ព

【静水項5】 前配ア グロバクテリウム属細菌は、Tiまた #RIブラスミドを持つアグロバクテリウム属植苗であっ Agrobacterum tumefacionsのTiブラスミドpTiBo542

4項1記載の方法

のヴィルレンス観域由来のDAA断片を含むプラスミドを

導入したア グロバクテリウム 厲細菌である請求項 1 ない しょいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 前記DNW断片を含むブラスミドはpTOK162又 cterium tumefacionsである語求項 1 ないし 8 のいずれ 【請求項7】前記アグロバクテリウム属細菌は、 はその誘導体である請求項5記載の方法。 か1項に記載の方法

【請求項8】形質転換操作に用いるアグロバクテリウム **阪紬苺の街浪技が10~10~1番/m/である酵水項 | ない** し7のいずれか1項に記載の方法。

の前処理を行わず形質転換に供する請求項」ないし8の 【請求項9】前記の培養組織を酵素処理や傷つけるなど いずれか1項に記載の方法。

後、脱分化過程または脱分化状態で形質転換細胞または 【耐水項10】前記の培養組織を形質転換に供試した

3

符款2848287

8質転換組織を適抜する請求項1ないし9のいずれか1 瓜に記載の方法

片を 脱分化誘導 告地に 圏床後7日以上のカルス形成過程 【翻求項11】前記数分化過程にある培費組織は、外植 にある培養組織である間求項」ないし9のいずれか1項 **た記載の方法** 【酵水項12】前記培養組織が単子葉植物の体細胞由来 の倍級組織である請求項1ないし11のいずれか1項に配 故の方法。

【静水項13】培養組織が正常な個体を再生する能力を **育する組織である請求項1ないし22のいずれか1項に記**

発明の詳細な説明

技術分野

本発明は、単子葉植物の形質転換方法に関する。

クトロボレーション法、ポリエチレングリコール法(氏 単子葉植物の形質転換方法としては、従来より、エレ

エレクトロポレーション法は、プロトブラストと目的 のDNAを混合し、電気刺激で細胞膜に穴を開けることに G供)、バーティクルガン社やの他が知られている。

遺伝子が単子葉植物、特にイネに導入されている (Torl yama K.et al., 1988; Bio/Technol.6:1072-1074, Shiman oto K.et al., 1989; Nature 338: 274 - 276, Rhodes C.A.et る。現在、最も再現性のある手法で、この方法で種々の ラストから個体再生までには数か月を要するので、形質 転換体を得るのに時間がかかる、3) 培穀期間が長期化 の方法は、1)プロトプラストからの個体再生系が確立 されている植物種にのみ適用可能である、2)プロトブ するので、それに伴う培養変異の頻度が高くなり、正常 な形質転換体を得る確率が低くなる、という問題点を有 al.,1989;Science240:204-207) 。 しかしながら、C よりDNAを細胞内に導入し、形質転換を図る方法であ

RG法は、目的遺伝子とプロトプラストとを混合し、P 換体を得た報告はあるものの、広く用いられているとは 988; Thcor. Appl. Genet. 76:835 - 840, Datta S.K. et al., **宮い難い。 ブロトブラストを用いるため、エレクトロボ** レーション法と同様な問題点を持つ (Zhang W.et al.,1 ECで処理することによって遺伝子の導入を図る方法であ **法よりはいくふん低いと考えられる。この方法で形質転** わった点で異なる。導入効率はエレクトロポレーション り、エレクトロボレーション法とは紀気刺激が氏のC数 L990; Bio/Technol.8:736-740) .

されていない植物種に有効である。形質転換効率は、遺 パーティクルガン法は、目的の遺伝子を後細な金属粒 ち込むことによって形質転換を行わせる方法である。従 って、原理的にはあらゆる組織を対象に形質転換を行う ことができ、特に、プロトブラストからの再生系が確立 子に付着させ、金属粒子を高速で細胞あるいは組織に打

- ション社と効器を比較したデータはない(Cordon – Ka et al.,1990; Bio/Technol.8:833-839, Christou P.et a mm W.J.et al., 1990; Plant Cell2:603-618, Fromm M.E. 天子を打ち込んだ後の遊抜に依存する。 エレクトロボレ 1.,1991;810/Technol.9:957-962) .

-)、3) リポソーム法 (Caboche M.1990;Physiol.Pla 策 (Topfer R.et al.,1989;Plant Cell1:133-139,Ledo ux L.et al.,1974Nature249:17-21), 2) 花粉管への その他の方法としては、1)種子、胚とDNeの共存培 处理 (Luo and Wu1988;Plant Hol.Biol.Rep.6:165 ខ្ព

4) マイクロインジェクション法 (Nouhaus G.et. al.,1 987;Theor.Appl.Cenet.75;30-36) があるが、形質転換 の効率、再現性、あるいは汎用性に関して問題があり、 一般的な方法とは含い難い。

寄生しないとされている (De Cleene M.1976;Bot.Rev.4 相図の宿主は双子菜植物のみに限られ、甲子菜植物には 一方、アグロバクテリウム医苗紐のTiブシスミドやく クターとして用いた遺伝子導人法は、タバコ、ペチュニ ア、ナタネ等の双子葉作物の形質配換法として登過的に 用いられている。しかしながら、アグロバクテリウム国 2:389-466) 2

してはアスパラガス (Bytchier B.et al.,1987:Proc.Na tl.Acad.Sci.USA:84:5345-5349)、そしてヤム (Diosc orea bulbifera) (Schaferw, et al., 1987; Nature 227:5 アグロバクテリウムによる単子鉄植物の形質転換に関 特にイネ科作物にはこの方法を適用できないとされてい 29-532) で報告されているが、その他の単子英植物、 5 (Potry/las 1.1990;8io/Technol.8:535-543)

上の観察結果はアグロバクテリウムがトウモロコシKDM Grimsley et al,1987:Nature325:177-179477 91377 ストリークウイルスの配体を暗認したことを報告してい る。しかし、ウイルスは核ゲノムに相み込まれなくても 組み込まれたことを示すものではない。その後、脳気効 単はトウモロコシの茎頂の生長点に依確した時が最も高 遺伝子が必須であることを示した(Grinsley et al.,Mo トウモロコシの生母点に接続したところ、トウモロコシ る。トウモロコシストリークウイルスのUNAを接種した 9)、 政権にはアグロスケテリウムのグルス … ドのとん クテリウムのT-DNAの中にトウモロコシストリークウ イルス (Maize streak virus) のDNAを伸入したものを だけではこのような感染症状が因められないことから、 **|冷導入することができることを示すものと解釈してい** 均滑する可能性があるので、この結果はT - DNAが核に Crimsley et al., 1988; Bio/Technol.6:185-18 **\$**

はトウモロコンの基項に針で傷をしけた役カナレイソン テリウムEHAIを接倒し、処理後の塞頂組織をカナマイシ Gould J.et al. (1991; Plant Physiol. 95:426-434) 抵抗性遺伝子とQK遺伝子を持った徴病原性アグロバク S

l.Cen.Cenet.217:309-316) .

ンで遺抜したところ、抵抗性を示す植物体を得た。この 後代の個子の一部は導入した遺伝子を持つことをサザン 分析で確認した(キメラ現象)。

るカルスが増殖したが、このカルスからの植物体の再生 はできなかった。また、カナマイシン抵抗性遺伝子の存 Mooney P.A.et al., (1991;Plant Cell,Tissue,Organ た。まず、胚を酵素で処理し、細胞點に傷をつける処理 をし、その後アグロバクテリウムを接倒した。処団した カルスのうち結めて少数のカナマイシン抵抗性と思われ 在をサザン分析で確認したところ、全ての抵抗性カルス Culture25:209-218) は、アグロバクテリウムを用い て小変の胚にカナマイシン低抗性遺伝子の導入を試み で導入遺伝子の構造変異が見られた。

日本時、藤坂5号の2品種で暗璃状の組織の増殖が見ら **ネの胚盤に格をつけた後、独房原性のアグロバクテリウ** 子を仰人したブラスミドを持つアグロバクテリウムをイ ネの胚に接張したところカナマイツン抵抗性カルスの増 が認められたが、形質転換値物を仰ることはできなかっ た。これらのことから、アグロバクテリウムのT-DNA たTi ブラスミドにカナマイシン抵抗性遺伝子とGDS遺伝 首が見られた。この抵抗性カルスではQS遺伝子の発現 Raineri et al. (1990;Bio/Technol.8:33-38) 114 hた。さらに、T-DWがちホルモン合成遺伝子を除い AA281 (pTi8o542) をイネの8品機に処理したところ、 がイネ価数に導入されたと解釈している。

ついても完全に説得できる枯果を示しているとは含い難 このように、イネ、トウモロコシ、コムギ苺のイネ科 の作物でもアグロバクテリウムによる遺伝子導入が可能 であることを示唆する研究報告が現れてきているが、ま エレクトロポレーション法が主流であるが、プロトブラ 8大な労力がかかり、また長期間の培養により高頻度で **変異体が出現するという危険性がある。また、この方法** だ、神現性、導人効率、さらには遺伝子の導人の確認に ストを用いるため、再生植物を得るまで長期間を費し、 上述のように、イネ科作物における遺伝子導入法は、 42 (Potrykus 1.1990;Bio/Technol.8:535-543)

しかし、生民点を単儲する作数は多くの労力を要し、大 はブロトゾラストからの再分化系が確立されていない作 **数、例えばトウモロコシには適用できない。そこで、上** むのように、トクモロコシに対しては、生長点組織を用 いることが試みられている (Gould J.et al.,1991). **型に調製することは必ずしも容易ではない。** 従って、本発明の目的は、従来の方法に比較して、形 質核数から植物体の再生までの時間が超く、プロトブラ ストからの植物体の再生系が確立されていない植物に対 しても普通的に適用することができ、さちに用いる材料 の調製が容易な単子菜植物の形質転換方法を提供するこ

ន 本の発明者らは、アグロバクテリウムで処理する単子

葉の植物組織、 アグロバクテリウムの処理条件、及びバ イナリーベクターの構成等が遺伝子導入効率に及ぼす影 響等を鋭意研究した結果、単子葉植物の培養組織をアグ ロバクテリウム属細菌を用いて飛躍的に高い効率で再現 れによれば上記目的を達成することができることを見出 性をもって形質転換することができることを見出し、こ し、本発明を完成した。 すなわち、本発明は、所望の遺伝子を含有するアグロ パクテリウム属細菌で単子集植物の既分化過程にある培 資組織又は脱分化した培養組織を形質転換することから

を用いる従来技術に比べて供試材料を容易に得ることが オオムギ等のイネ科植物を始めとする単子葉植物に目的 なった。アグロバクテリウムを用いた単子葉植物の形質 転換方法はこれまでにもあるが、前述のとおり確立され **調製が容易なカルス等の培養組織を用いるので、生長点** ラストを形質転換する場合に比べて植物体再生までの時 に、適切な接種後の選抜法を採用すれば、目的遺伝子が た方法とは言い難い。しかし、本発明ではこれまでに用 いられていない培養組織に本発明で改良した方法でアグ ロバクテリウムを接種することにより、極めて容易に遺 できる。また、培養組織を形質転換するので、プロトブ ナリーベクターを用いれば、一部のイネの品種のように が可能になった。さらに、後述の実施例に記載するよう キメラ状に導入されるキメラ現象を低減させることもで の外来遺伝子を再現性良く導入することが初めて可能に 伝子を導入することができた。本発明の方法では、材料 間が短く、変異の頻度が低下する。また、スーパーパイ **培養が困難な品種にも高い効率で遺伝子を導入すること** 本発明の方法により、イネ、トウモロコシ、コムギ、 成る、単子英値物の形質転換方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の方法に用いることができるアグロバ クテリウム原細菌に含まれるブラスミドの一例であるが CK162の構造と本発明の実施例で用いたブラスミドpTOK2 32の構築方法を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法により形質転換される単子葉植物は、特 に限定されるものではなく、イネ、トウモロコシ、オオ ムギ、コムギ、アスパラガスその他、いかなる単子葉植 物にも適用可能である。

\$

質を含む培地で培養することにより得られる組織で、カ ルス及び不定胚様組織が形成される前段階の組織を意味 し、脱分化した培養和機とは外値片をオーキシン及びサ また、本発明の方法に供される培養組織は、単子英値 物の脱分化過程にある培養組織又は散分化した培養組織 である。ととで、睨分化過程にある培養組織とは、外植 片をオーキシン及びサイトカイニン等の植物生長調節物 イトカイニン等の植物生長戦節物質を含む培地で培養す ることにより得られるカルス及び不定胚様組織を意味す

る。本発明で用いられる培養組織はいかなる部位由来の 明で用いられる培養組織としては、既分化誘導倍地に外 植片を路床した後7日以上経過したカルス形成過程にあ 機として用いることが最も好ましい。脱分化認導培地は g/l 2,4-D、1g/lカザミノ酸、30g/lショ館、2g/ゲル ライトを添加した培地及びLS倍地(Linsmaier, E., and S looog, F. 1965; Physiol. Plant18:100-127)の無機堪及び 加した培地等を用いることができる。もっとも、本発明 ものであってもよく、例えば、胚盤、茎頂、幼根、未然 胚、花粉及び葯由来のものを挙げることができる。本発 が好ましい。中でも、カルス及び不定胚様組織を培養組 Cの分野において周知であり、例えばNG音曲 (Chu.C.C. 1987; Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press アタミン類に100mg/1カザミノ製、700mg/1プロリン、1. の方法に用いる培養組織は必ずしもカルスである必要は る培養組織、又はカルス及び不定胚様組織を用いること Smg/l 2,4-D、20g/lショ樹、2.3g/lゲルライトを添 なく、断質質的のあってもよい。

al.,1984;Bio/Technol.2:702-709,Hood E.E.et al.,19 6;J.Bacteriol.166:88-94,Jin S.et al.,1987;J.Bacte ター(本明相母においた、このペクターを「スーパーパ イナリーベクター」と呼ぶことがある)を開発した(特 既平4-222527号)。 このようなスーパーパイナリーベ 数(xin質数)由来のDM級域を含むペクターを有してお スミド中に存在し、相同組換え等によりTiブラスミド中 らば、先に、Agrobacterium tumefaciens A281という協 riol.169:4417-4425, Komari T.1989; Plant Science60: (Jin S.et al., 1987: J. Bacteriol. 169:4417-4425) Ø 従来より双子葉植物の形質転換に用いられているものを 用いることができる。これちのものの多くはAgrobacter り、植物に付与しようとする形質を担う遺伝子はこの人 クター中に挿入されるか又はこのベクターとは別のブラ 成原性の、形質転換効率が極めて高い体(Hood E.E.et 86; J. Bacteriol. 168: 1283 - 1290, Komari T. et al., 138 ジェラフンス部及(vi を放)由米のDNA独放の40人グ 形質転換に用いられるアグロバクテリウム属細菌は、 inn tunefacions由来のTiブラスミドのグィルレンス製 223-22外ICC37394) 化合まれるTiブラスミドpTiBo542 にin vivoで増入されるものである。また、本観発明者 クターを本発明において好ましく用いることができる。

及びAgrobacterium tumefaciens中で増発可能であるpTO T領域を含むプラスミド)にpTiBo542のヴィルレンス切 このようなスーパーパイナリーベクターの例として ロ る。その構造を図1に示す。このブラスミドは、大助商 QSAと呼ばれるブラスミド(Tiブラスミドから観導され **母、米国特許出関第07/824,844号)を挙げることができ** た公知のpcw2プラスミドとpvCcl01と呼ばれる公知の 広宿主域ブラスミドから後述の方法により構築された、 OK162 (特四平4-222527号, 欧州特許公岡斯504869

境界配列とその間に単子菜植物に導入しようとする遺伝 子としてカナマイシン耐性遺伝子が配列されており、こ の例は、単子葉植物に導入しようとする遺伝子がpititos を含有するブラスミド上に配置されている例である。な 数由来の既にクローン化されていた上記15.2キロベース のkpul形片(から、arc、arcを通行すを合む)を結め 込んだものである。このpiods4cは、丁寅城の2つの 40のグィルレンス包数由来のクローン代されたCNA析片 お、図1中の各符号は次の意味を有する。

特許2649287

€

9 スペクチノマイシン抵抗性遺伝子 IF

<br APT カナレイツン既抗性遺伝子

に テトラサイクリン抵抗性遺伝子 T-DWの右ボーダー配列 イントロンの6週形子

T-DNの左ボーダー配列

vir8,C,C 数角原性アグロバクテリウムA281由来のvir が

ORI COLEIの複製開始点

の5 シムダファージのCOS単位

制限群素Kpn I即位

却因群来Hind III的位

プラスミドの下颌域中の制取群群部位に依法により組み 込むことができ、ブラスミドが有する疑利耐性等の適当 な苗沢マーカーに基づいて苗沢することができる。もっ **単子禁瘡物に組み込もうとする所質の遺伝子は、上記** 節位を持つものは、過ばのサブクローバングの手依では とも、図1に示すpioxi62のように、大型で多数の何限 所型のDwをT領域内に導入することが必ずしも容易で

はないことがある。このような場合には、Agrobacteriu m tumefaciens細胞内のin vivo系での相同組換人(Herr era-Estrella L.et al.,1983;EMEO J.2:987-995,Hors **ことにより、目的のUNAをplOKIGKに導入することが可能** になる。すなわち、例えば、先ず、pIUKUSをAgrobacte ブラスミドを含む)を導入する。pickcicのUnvicitoBR3 ch R.H.et al.,1984;Science223:496-498) を利用する rium tumefaciens仏学入しておいて、この弦ださらた所 22と相同な部分があるので、pBR322路導体は相同配列を 望DNAを導入したpBR322と呼ばれるブラスミド(類似の 介した組み換えによりpTOQGに組み込まれることにな **\$**

る。pBR322はよTOK162と異なりAgrobacterium tumefacie ができる。さらに、pTOK162を存するAgrobacterium tum rs中では複製できないので、このような組み込まれた状 徴(pTCK162::pBR322数導体という)でなければAgrobac terium tumefaciens中で生存することができない。そし (業利耐性等) について選抜すれば、pTOK162::pBK322 て、pTOKIG2とpBR323影導体のそれぞれに特異的な特性 条導体を有するAgrobacterium tunefaciensを得ること efactonsに各種のブラスミドを導入して研究したとこ

ろ、p8R322誘導体の選抜マーカーとしては、トランスポ ន

限定されるものではなく、望まれる性質を付与すること かできるあらゆる遺伝子が包含される。例えば、除草剤 抵抗性遺伝子、抗生物質抵抗性遺伝子、ウイルス腐抵抗 性を付与するためのウイルスのコート蛋白質遺伝子及び **単子葉値物に導入しようとする所望の遺伝子は、何ち** 胚乳の政的形質関連遺伝子などを挙げることができる シン財性遺伝子から分離することも可能となる。

哲主となるアグロバクテリウム属相関としては、特に 限定されないが、Agrobacterium tumefaciensを好まし が、もちろんこわらに限定されるものではない。

パクテリウム両細菌に導入する操作は従来法により行う 30 ことができ、例えば、相函の三系交雑手法(Ditta G.et al.,1980; Proc.Natl.Acad.Sci.USA77:7347-7351) 12 プラスミドをAgrobacterium tumefaciens等のアグロ く用いることができる。 より行うことができる。

れるので、高い効率で単子薬植物の形質転換を行うこと このようにして割製されるアグロバクテリウム属相函 なは、plok1成由来のヴィルレンス能力の高いDNAが含ま

に配配されるものであるが、アグロバクテリウム域相當 尚、本発明においては、単子葉植物に導入しようとす る遺伝子は、従来の技術と同様にT領域の境界配列の間 中で、Tiブラスミド上に配置されてもよく又は他のブラ が回能である。

수

の培養液中にアグロバクテリウム原細菌を認加して共存 することにより行うことができる。あるいは、培養組織 リウム原葡萄糖質液を調製し、この糖質液中に培養組織 を3~10分間程度浸渍後,固体培地上で数日間共存培發 アグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の培養組織を 形質転換する方法は、培養組織をアグロバクテリウム属 細菌と単に接触させることにより行うことができる. 例 えば、10 / Дロ・細胞/向程度の細胞線度のアグロバクデ スミド上に配置されてもよい。

ように、本発明の方法では、培養組織を酵素処理や傷つ **信殺することにより形質転換を行うこともできる。この** ける等の前処理を行わずに形質転換に供することができ

グロマイシン等の選抜マーカー及びアグロバクテリウム **原細菌に対する抗生物質を添加した培地で培養すること** 形質転換に供試した培養組織は、その後、既分化過程 又は散分化状態で形質転換細胞又は形質転換組織を選抜 ン、サイトカイニン等の植物生長調節物質を含み、ハイ することが好ましい。これは当該培養組織をオーキシ により行うことができる。

を行うことができる。これにより、形質転換により所望 母抜した細胞又は組織は公知の方法により再分化培養 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明す の形質を獲得した植物体を再生することができる。

る。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるもので ETT.

実施例1

速成できる。また、両丁領域が別々の染色体に組み込ま れる場合もあり得るので、後に目的の遺伝子をカナマイ (1)供試培養組織の調製

日本福品種、朝の光、月の光及びコンヒカリを遺定し (i) イネの品種 2

イネの完熟量子を70%エタノールに1分間、1%次亜 (ji) 胚盤, 胚盤カルス た供試した.

した後、2NG固体培地(NGの無機塩類及びピタミン類(C hu C.C.1978; Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science また、完熟種子を図床後4日目に程子より胚盤部位を摘 塩素酸ナトリウム3に0分間浸漬することによって消毒 形成された胚盤由来のカルスを2NG培地に移植し、4~ Press Peking,pp.43-50)、1g/1カザミノ酸、2mg/1 2,4-D、30g/1ショ链、2g/1ゲルライト)に置床した。 出し胚盤として供試した。完熟電子を約3週間培養後、 日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

(111) 案顶組織

イト)に置床し、培養3日後の幼苗から、頂端分裂組織 イネの完熟種子を上配の方法で消毒した後、1/2MB タミン類、1g/1カザミノ酸、20g/1ショ糖、2g/1ゲルラ 体培地(1/2量の16の主要無機塩類及び液量塩類、16ピ を含む2~3mの組織を切り出し、材料とした。

5~10mm切り出して材料とした。また、これらの幼根を 2N6団体培恤上で約2週間培養して得たカルスを幼根カ (iii) の方法で得た幼植物体から種子根の先端部を (iv) 幼根組織、幼根カルス

(^) 聚倒培教相酌 ルスとして用いた。

473-497)、0.5g/1カザミノ酸、1mg/1 2,4-D、0.2m 重值類 (Murashige and Skoog 1962;Physiol,Plant,15: (A)主要無機塩類、A/フミノ酸及びANビタミン類(Tori yama and Hinata1985;Plant Science41:179—183,MSA数 (ii) の方法で得た胚盤由来のカルスをAX液体培地

22

移し、25G、暗黒下で120rpmで振盪することによって野 衛培養細胞を得た。なお、培地の更新は1週間毎に行っ g/カイネチン、0.1mg//ジベレリン、20g//ショ档)に

カルクロニダーゼ (QIS) 遺伝子をTiプラスミドのT-D ロンを含むOS遺伝子と、ハイグロマイシン抵抗性遺伝 クノロジーII (現代化学増刊、pp.123-132) 、名古園 子と連結したブラスミド (中村ち、1991;植物パイオテ ハイグロマイシン低抗性遺伝子(14T)及びβ-D-(i) pIG121hm:ヒマのカタラーゼ遺伝子の第1イント W領域に組み込んだ、以下のブラスミドを作製した。 (2) ガブラスミド (パイナリーベクター)

1.イントロンGNS及びハイグロマイシン抵抗性遺伝子の 大学、中村氏より入手)。 (ii) pT0lQ32:

びスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を持つブラスミドの Tn7由来のスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含むCla し、これを女C19のSma 1単位に辞入し、アンガツラン及 処理し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含む2.5kb 断片をpca48のEcoR I. Hind III断片 (2.7kb) と連結 し、スペクチノマイシン低抗性遺伝子とHind III、tha OCIO7 (5.214) を得た。PTOKIO7をEcoR I, Hind IIIで 1断片(2.5㎏)をクレノー処理により末端を平帯化 I部位を含むpTOK170 (5.2kb)を得た。 中間ペクターpTOIG29への導入

(7.6仏) を得た。なお、pGLZはpDH51 (Pietrazak et a イグロマイシン抵抗性遺伝子 (Gritz L.and Davis J.19 プラスミ F pGL2 ().Paszkowski,Friedrich Mieocher In をtpa I処理して得られた断片をpG.2-IGOPw II断片 末端を平滑(ŁしHind IIIリンカー(pCAACCTIC;タカラ酒 ロモーターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子を連結した 83;Gene25:179-188) の抑入したものである。 FTOGL70 造コード460P) を挿入した。355プロモーター及びイン トロンQDを含む断片をHind IIIにより切り出し、355プ 1.,1986;Nucleic Acids Research14:5857 - 5868) 12.n ンとGS遺伝子を連結したベクターpIG21 (Ohta S.et a 中村氏より譲渡)をEcok Iで切断後クレノー酵素により 355プロモーターにヒマのカタラーゼの第1イントロ 1.,1990;Plant Cell Physiol.31:805-813,名古国大学 stituteより入手)のHind III部位に挿入しpd.2-1G (5.21d) と連結しpTOIC29 (10.11d)を得た。

両プラスミドの組換えによって生じたプラスミドのみが スペクチノマイシン、カナマイシンで選抜された歯には パイナリーベクターに強病原性アグロバクテリウムな 81田来の51年、51元、51元遺伝子を神入して得たスーパ 人は相同組換えによって行った。 すなわち、 両ペクター ーパイナリーペクターpTOKL&への目的遺伝子 (ハイグ ロシイツン抵抗性遺伝子、イントロンGA遺伝子)の導 は大腸菌ブラスミド pBR322に由来する部位を持つので、 2) スーパーパイナリーベクターpTOKIGSへの導入

特許2649287

9

含まれることになる。スーパーパイナリーベクターだい イグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンのK遺伝子が 組み込まれたプラスミドをpTO/C32と呼ぶ (図1登

(3) 쏩主アグロバクテリウム

スミド(いん仏域を完全な形で持つ)PAL4404を付する位 T-DNG域を削除した図系、LBA404とEIA101とを容 ミドのいん気気が貧労原性アグロバクテリウムA281出来 茶であり、American Type Culture Collectionより人手 可能である (ATCC 37349) . EHA101はヘルバーブラス 主バクテリアとして使用した。LBAA404はヘルバーブラ であり、Hood E.E.et al.1986かち入手可能である。

tta G.et al.1980;Proc.Natl.Acad.Sci.USA77:7347-73 伝子導入用として用いた。 これらのブラスミドをアグロ パクテリウムに導入する方法は細菌の三系交雑手法 (Di 2種類のアグロバクテリウムに導入し、以下の箇系を遺 (2) 項で述べた種々のパイナリーベクターをこれち

LBA4404 (pTOIC332) 51) によった。

20 LBA4404 (pIG1211th) EHA101 (pIGI21HM)

M. グルコースを0.2MC変更し、アセトシリンゴンを10 g/ml)を含むAIG指(Orlica K.A.and Kado C.I.1974;P とり、修正AA倍地(前述のAA倍地において、ショ館を0. roc.Nat1 Acad.Sci.USA71:3677-3681) 上で3~10日間 **均費したアグロバクテリウムのコロニーを自会耳でかき** On M符首、Ats.5) 不覧扱つ、経過関か3~6×19 苗 ハイグロマイシン(20mg/ml)とカナマイシン(50m (4) アグロバクテリウム胚剤液の調製 粒/mlに調整し接程に用いた。

のセフォクキンムを含むそれぞれの固体培地で培養を税 1ン=類を含むNGS3固体语地(1/2NG主要無機相類、NGX 桐苔餅、N6パタミン盤、Chu C.C.1978、A7ミノ駁(To riyama and Hinata1985),1g/1វ/げミノ鼠、0.2mg/1 NA A 1.0mg/カイネチン、3g/ゲルライト)に、胚盤カル スなどのその他の培養相違はアセトシリンゴン、グルコ ース、ショ館を同議度で含む2NG固体培地に移植し、25 ·C、暗黒下で2~5日間培費した。その後、接種組織を 250mg/1セフォタキシムを含む協協水で洗浄し、同協度 4の慰園後に3~10年間設設した。設設処理後、港瓜館 格は100mMアセトシリンゴン、10g//グルコース、20g/ 供試組織を試留水で洗浄後、上述のアグロバクテリウ (5) 按租条件

躍した。リン酸極衝液でアグロバクテリウムを洗浄除去 共存培養処理直後、組織を0.1%Triton X-100を含む した後、0.1mM 5-プロモー4-クロロー3-インド So リルーβーD-グルコン数(X-gluc)及び20%メタノ 0.1Mリン取積衝液(pr6.8)に没済し、3/Gた1時間静 (6)cus活性の調査方法

(1) 形質転換相関、組織の遺抜 (1) 迷点粗糙

5 日間アグロバクテリウムと共存培費した茎頂組織を し、生長した繁頂組織を40mg/1ハイグロマイジンを包む 250mg/1セフォタキシムを含むN6S站街で2週間培養 4551培地に移して、形質転換体の遺抜を行った。

3 日間共存培会した配盤を250mg/1セフォタキシムを stornsは出で1週間培養した後、Song/Jハイグロマイ ソンを含むInd各地で形質転換細胞の遊抜を行った。

(iii) 培養組織 (配盤カルス)

b個体再生用培地M633に移した。なお、共存培養後の培 シムを含む2NG倍地で1週間培養した後、同培養組織を5 シンを含むNS-12倍冶(NS無磁塩組、NSビタミン類、2g イト)で2~3週間培養し(2次遊抜)、この培地上で Dra/1パイグロシイシンを含むSNG倍指で3週間倍級した ハイグロマイシン低抗性の培養組織を選抜した (1次選 抜)。 得られた抵抗性組織をさらに Somg/1ハイグロマイ **街路したカルスを0.20.20mg/1ハイグロマイシンを包** ハカザミノ(数、0.2mg/12,4-D、0.5mg/1 6BA、5mg/1 3日間共存培費した培養組織を、250mg/1セフォタキ ABA、30g/レンドガトール、20g/アッ=語、2g/アゲッ 법には全て250mg/1セフォタキシムを添加した。

(iv) 弱离柏做苗园

5 日間共存培養した懸腐培養細胞を250mg/1セフォタ キシムを合む2NG倍指で1週間倍限した後、SOmg/1ハイ グロマイソンを含むZwd色地で形型転換価数の過払を行

(8)形閣転換次世代における導入遺伝子の発現

形型転換次世代の程子を70mg/ハイグロマイシンを含 形質転換次世代の様子を各2位とし指揮し、約3週間後 D400倍ホーマイ水和郊水浴液中に指揮後、25℃で10日 間処理し、ハイグロマイシン抵抗性を調査した。また、 の笛から低片を採収し、QK遺伝子の発現を調査した。

수

(9) サザン法による導入遺伝子の分析

品種、朝の光、月の光の形質気換体当代について、小 聞らの方法(Komari et al.,1989;Theoretical and App 片の及さは、約5.5kbであり、この観域のT-DNの内部 したOWAC知及酵素Hind 111を処理し、HPT遺伝子をプロ lied Cenetics77:547-552) に従いDNAを抽出し、抽出 ーブとし、サザン法による導入遺伝子の検出を行った。 パイナリーブラスミド上のHPT遺伝子を含むHind III断

法に従って行った。また、"月の光"の形質転換次世代 の2 系統について、GLS操作、GLS数件、ハイグロマイジ ン抵抗性の各個体を2個体がつ供試り、回様な手法によ 法についてはMolecular Cloning (Sambrook et al.198 のHind IIIサイトからしボーダー配列の末端までのDWA **饭板の長さは、約5.440である (図1)。 なね、サザン** 9;Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載の方 りサザン分析を行った。

(10) イネでの供試材料の違いによる遺伝子導入効率

入することが可能であることを確認するため、強病原性 クターpIG121hm (上述) を導入した菌をイネ品種月の光 ルス及び懸濁培養細胞である。アグロバクテリウムで処 ウムEHA101 (pIG121hm) で処理した場合には、幼根を除 盤カルスが優れていた。胚盤カルスに次いで高い導入率 を示した組織は茎頂であった。また、胚盤の脱分化組織 である胚盤カルスおよび懸菌培養細胞で高い導入率を示 を示すものは認められなかった。一方、アグロバクテリ **育色を呈する組織の割合では胚盤カルスが最も苗かった** このことは、より細胞分裂の活性が高い組織に遺伝子が アグロバクテリウムが単子葉作物の細胞に遺伝子を導 た。供試相檔は茎頂、幼根、胚盤、幼根カルス、胚盤カ く組織でGLSの発現が確認された。処理組織数に対する のvir威域を持つアグロバクテリウムEHA101にハイグロ マイシン抵抗性遺伝子 Facs遺伝子を持つスイナリー人 理しなかった場合は、いずれの材料でも背色のdus発現 (表1)。さらに、asを発現する組織の大きさでも胚 したのに対し、胚盤では明らかに導入効率は低かった。 の種々の組織に処理し、共存倍整後にQISE性を調査し 導入されやすいことを示唆するものである。 (共存培養後におけるQLS発現) 2

次1 供試材料の違いによる CLSin伝子の導入効率

供权組織	(US+の組 機能(%)	GIS+の組織数/処理組織数(%)	の 本本 る の の は が が が が が が が が が が が が が が が が が
	和學學区	对证证	大きさ
工工	(0)0£/0	(69),191/601	#
幼根	0)02/0	0)06/0	
幼根カルス	(0)0E/0	24/115(21)	+
压载	0/20(0)	(6)69/8	+
胚盤カルス	0/141(0)	312/395(79)	#
服務格数相因	(0)252/0	61/247(25)	#

+:1%以下, +:1~10%, +:10%以上

入されているため、アグロバクテリウムの細胞の中では この実験で使用したパイナリーベクターpIGIZUhrでは ロ区制

のトロンロホーケーの中

のトロンファーケーの中

のアントロンが容 ら、1991)。以上のことから、共存培養後のGK遺伝子 as遺伝子は免現しないことが確認されている(中村

ន

特許2619287

会気 なび は の 過いによる 形 国 転換組織および細胞の出現 効率(品種:月の光) 报2

	供式組織	ハイグロマイツ: 理組織数(%)	ハイグロマイシン低抗性組織数/処 理組織数(%)
		发现现货	对即改
	五五五	(0)02./0	(0)41/0
	KE	0/30(0)	0/18(0)
	胚盤カルス	(0)05/0	169/743(23)
드 -	配因的数值包	0/220(0)	22/254(8)

四 イネの品種による遺伝子導入効率の違い(共存 格養後におけるGLS発現)

の点を明らかにするため、コンヒカリと月の光の培養容 方、前項で用いた月の光は比較的培養が容易である。ア グロバクテリウムによる形質転換法を用いる場合、この **易性の異なる2品種を用いてアグロバクテリウムによる** 遺伝子導入効率の差異を調査した。供試組織は胚盤カル **培養細胞の確立、培養細胞から個体再生に関しては大** 8;Plant Cell Tissue Organ Cult.12:311-314),日本 ような品種間差異があると実用的には不都合である。C スとし、アグロバクテリウムとしてはEM101 (pTG121H きな品種間差異が存在する(Nikami and Kinoshita198 稲の中ではコシヒカリは柏敦が困難とされている。一 m) 及びLBA4404 (pIGIZ出加) を用いた。 2

性が認められたが、コンヒカリではこれより低い事での S古性が退められた (表3)。従って、EM101 (piGL21H m) あるいはLBA4404 (pIG1211hm) を用いた場合には、導 月の光では各英駿を通じて90%以上のカルスでの1655 入効率に関する品種間差異があるものと解釈される。

数3 アグロハクテリウムの国 SGIS遺伝子の導入効率

		GE+9#	GIS+の組織数/処理組織数(%)	数数(%)
			※国	
野野	栄験	(PICIZIHA)	EHA101 (p1G121Ha)	(pTCRCSS)
月の光		(96)01/19	78/87(90)	64/66(97)
月の米	2	72/80(84)	68/73(83)	(001)28/28
コジヒカリ	1	(1E)SE1/91	46/135(34) 43/116(37) 124/131(95)	124/131(95)
コンド	2	28/107(28)	28/107(26) 81/143(57) 102/103(99)	102/103(99)

\$

(13) アグロバクテリウムの国系による遺伝子導入効率 の違い(共存治験後におけるCLS発現) EIMIOI (pICIZUM) はヘルバーブラスミドに徴展原性 アグロバクテリウムA281のvir微塩を持つ。LBM40M (pI G131年)は尚体の2.60数や指し。一方、CR449 (PTOK

ន

€

の発現を指標とした場合、アグロバクテリウムはイネ細 的に遺伝子を導入できることが確認された。

(11) 供試材料の通いペポる形質転換組織および細胞の

基濁培養細胞を用いて、ハイグロマイシンによる形質転 る。また、生長点近傍に遺伝子が導入され形質転換細胞 全ての組織が枯死し、抵抗性組織は得られなかった。茎 頂は生長点を含む組織であるが、遺伝子の導入処理を行 った後、抵抗性組織が増殖するためには、遺伝子が限ち れた生長点に導入される必要がある。アグロバクテリウ 可能性が高いことは容易に推測される。これらのことか 方法に比べ、技術的な困難性が高く、再現性の低い手法 共存培養処理を行った茎頂、胚盤、胚盤カルスおよび ムとの共存培養処理後、茎頂には多数の遺伝子が導入さ れているものの抵抗性組織が得られなかったことは、生 長点近傍に導入される確率が低いことによると考えられ ろ、Gould et al. (1991) により報告されている室頂を 用いた形質転換方法は、カルスなど脱分化組織を用いる が得られたとしても、得られる植物体がキメラ性を示す **行性を示す形質転換細胞の増殖が認められた(表2)。** 共存培養後、CUS発現の調査で高い遺伝子導入効率を示 換組機および形質転換細胞の選抜を行った。その結果、 また遊抜された細胞は、GNS遺伝子を一様に発現した。 した茎頂組織は、ハイグロマイシンによる選抜の結果 であると考えられる。

や影像品数笛脳や影響情数笛脳が伴られたのに対し、既 数では抵抗性細胞の増殖は認められなかった。また、Ra ineri et al. (1990) の方法に従い、傷をつけた胚盤を 供試組織として遺伝子導入を試みたが、遺伝子導入効率 完熟種子の胚盤に由来する培養組織である胚盤カルス の向上はみられず、形質転換細数も得られなかった。こ つけるなどの処理も必要なく、再現性良く、しかも高数 度で形質転換細胞が得られた。これらのことから、アグ ロバクテリウムによる形質転換の供試組織として、脱分 **hに対し、胚盤カルスを供試組織とした場合には、傷を** 化状態または脱分化過程にある培養組織が好過であると

6

は海路型である

232) はヘルパープラスミドのがrd環ば直落型である が、パイナリーペクターに発病原性アグロパクテリウム ASBOかrd保め一部の遺伝子を有する。そして、この パイナリーペクターはpiOGIGから派生したもので、LBA 4404 (piDAGIS) は双子変体的中でも形質能数の困難 な植物種に傷めて高率で形型形数や中で形質能数の困難 な植物種に傷めて高率で形型形数を可能とした(Saito Yet al.,1992;Theor.Appl.Cenet.83:670-683)。この イムに、設成原性の小成様の存在そのもの、あるいは 存在形態は形質変換の効率に入きく影響する可能性があ る。そこで、設備原性の小道伝子と関いて、GASIEだが る。程のアグロパクテリウムを用いて、GASIEデの 発現に関する導入効率を比較した。なお、供試材料はコ シェカリ、月の光の胚盤かルスである。

数房原性のving複を持たないLBa40a(pIGI21m)でも国品種ともGGS指性を示す組織が認められたが、コンヒカリではその単は30%程度と低かった。ヘルバーブラスミド化資房原性のvine 持つBu410(pIGI21m)ではコンヒカリの導入器はやや上昇した。バイナリーペクターに適時原性のvine 持つLBu40a(pIGC31)ではコシヒカリでも月の光と同様につBu40a(pIGC31)ではコシのかられた(表3)。さらに、GGS社を示すそれぞれの組織での背段域の面積に関しては、LBu40a(pIGC22)でなも大きく、高い導入率を示すことが観察され

(14) 団条の違いたよる遊抜効率(ハイグロマイツン耐

上項と同じ3つの菌系を用いて、月の光、コンとカリの医盤カルスとの共存培室後のハイグロマインン抵抗性カルスの選抜率に関する比較を行った。抵抗性カルスの出現率に関しては1884の4(670232)が表も高く、抵抗性カルスの選抜率に関する品種間整異は認められなかって、(表イ)、1884の40(670231m)あるいは19401(670211m)の2つの前系では、選抜率は低く、さる化特数 田壁にコシモカリではハイグロマインン抵抗性カルスの出現に2を周度なとどまった。従って、イネの形質転換に用いるアグロバクティーが全が原性のい。通伝子の一部を持つ184444(61023)が最も優れていると判定される。

特許2649287 18 表4 アグロバクテリウムの選 系の違いによる形質転換 効率の違い(医盤カルス)

		ハイグロマイ 理カルス数(ハイグロマイシン抵抗性カルス数/如 理カルス数(%)	カルス数/処
			迷躍	
品種	実験	LBA4404 (p1G121½b)	EHA101 (p G121Km)	LBM4104 (pT0K232)
月の光	-	91/338(27)	(97)102/621	139/301(46) 169/305(55)
月の光	2	59/421(14)	68/425(16)	68/425(16) 110/360(31)
月の光	3		10/521(2)	174/644(27)
月の光	4		20/349(8)	100/349(29)
コジヒカリ	-	6/269(2)		65/283(23)

(15) ハイグロマイシン耐性形質転換体におけるQK通で子の発現様式

このようにして得られた低気性カルスをさらに2次遺板にかけ、抵抗性カルスから個体を再生させた。再分化 間の倍地MS3Kハイグロマイソンを添加した区と無認加 の区を設定したが、無流加の場合には、の3名性がない。個体あるいは年メラ状に活在を示す個体が多数出現した。しかし、再分化倍低にハイグロマインンを添加した場合はこった。しかし、再分化倍低にハイグロインンを添加した場合はよったのような個体はカイブンをが加したはおいてクテリウムで処理したかった場合には、ハイグロマインン低が性あるいはの35年を示す個体は、カイグロマインン低が性あるいはの35年を示す個体は初られなかった。従って、このようなハイグロマイン、低抗性かしなから再生したの35番を両に示す個体は初らかりの4度があります。

表 ハイグロマイシン低抗性 カルスから再分化した値 物に おけるGLS端伝子の 発現(品種: 朝の光)

TO WANTE IT TO FERE	双定的陽性 キメラ 陰性	25 1 0	7 1 0	
1	III W	88	20	
1	/////	-	2	

新世神 | W公小

(固体の再分化まで特地にはハイグロマイシンを透加)

\$

(10)

ハイグロマイシン抵抗性 カルスから用分化した格 物におけるGE遺伝子の 発現(品種: 月の光)

9 X

	用生植物 体GISW性	1	2	21
光乾效.	植物体再 生カルス	1	11	15
MK I	供試ハイグロマイシン抵抗性カルス	3	æ	ଷ
	宋政団米	1.8AA40A (p1G121Ha)	EM101 (91G121Ha)	1.3/4404 (9.TOK232)

(個体の再分化まで始地にハイグロマイシンを添加)

表7 ハイグロマイシン低抗性 カルスから再分化した植 物におけるGS遺伝子の 発現(品種: 切の光)

	松 菜				
	神生相	တ	-	=	
系統数	植物体財 生カルス	9	4	=	
_	供試ヘイグロマ イシン抵抗性カ ルス	18	11	19	
	供質阻光	LBA404 (p iG121ffa)	EM101 (p1G121fb)	(9.TDIC232)	

(個体の再分化まで培地にハイグロマイシンを活加)

16) 形質転換体の倍数性および種子稔性

得られた形型情報体は、超雲内で栽培することにより 正常な生長を示し、外線から4倍体や音形を示す関体は 全く認められなかった。種子包性についても、一部に部 分不穏や完全不穏を示す個体もあられたが、大部分の個 体がほぼ正常な給性を示した。

(17) 形質転換当代および次世代における導入遺伝子の 発現と分析 形質転換体の全DuvをHind IITで切断したDw断片に対して、HP通伝子をプロープとしたサブン法により形質 40 配数体当代における導入通伝子の検別を行った。その結果、提式に全ての個体で1~数コピーの導入通伝子の存在が認められた(投8.表9)。プラスミドロCO22の中ではHP通伝子を含むHInd III断片は5.50であるのに対し、研究したすべての形態を換体には、約6の以上のバンドが認められた。このことは、TーDwが植物機色が不多があれた。このことは、TーDwが植物機色は一般もある速れたことを更付けるものである。なお、検出されたDwが行の展さが関係を多っ質なっていたことは、イネの数色体への遺伝子導入箇所がそれやH異なることを示すものであり、植物体内でのパケテリアの残算 50 ことを示すものであり、植物体内でのパケテリアの残算 50

特数2849287 20

によるものではないことが確認された。

ないかもしくは発芽後の生長は着しく阻害された。これ 伝子の発見ともに1因子分離にほば適合する遺伝的分離 な形で組み込まれたものと推測される。従って、この個 したところ、対照品種の種子では、ほとんど発芽を示さ の存在が推倒されるが、サザン解析の枯果も2因子の鎌 はは次世代むにイグロマイシン抵抗性につこれ1因子様 形質転換次世代個体のハイグロマイジン抵抗住を関金 8芽と生長を示した (表8,表8)。 また、これらのハイ 2 および3 – 2 は、分盤比から2 因子以上の導入遺伝子 コピーの導入遺伝子の存在を暗毀したが、このうちの一 本のバンドは30Pより超い声片であり、T-DMが不完全 グロマイシン抵抗性個体は、ass遺伝子の発現も認めら hた。多への系統ではハイグロシイツン抵抗性、 adsi を示した。 数8 における"朝の光"の形質転換系統1 に適合していた。数8の2-1の形質転換個体では、 の分類を示したものと考えられる。

有していたことは、同一の染色体または遺伝子座に複数 アー数を示した。形型転換当代のサギン分析により、導 くたの個体で、形質

情報

当代の個体と

回一の

バンドが

を **父世代箇体で、いずれも同一な2コピーの導入通伝子を** 数9では"月の光"の形質院数系統の多へが、次世代 所では一部の個体が1コピーであったほかは、複数のコ 4.グロマイシン斑抗性の各個体を2.個体がつ供拭し、サ 出され、導入遺伝子が形質転換次世代に遺伝しているこ たくイグロレイツン抵抗権もよびONS遺伝子の名叫につ 入街位子が1コアーであった1884よび2コアーであっ た16cの次世代2系統について、の5個性、ロ外格性、ハ ザン分析を行った。その結果、QNS数柱の個体を除くす とが示された。2コピーの導入遺伝子を持つ系統16c化 ついても、CUS場性およびハイグロマイシン抵抗性の各 の遺伝子が組み込まれたことを示唆するものである。 2 유

これらの結果は、アグロバクテリウムによりイネに導入された遺伝子が、植物知節の核に組み込まれ、メンデルの法則に従って、後代に遺伝したことを示すものであ。

22

体における導入遺伝子のコ サザン解析による形質転換 ピー数および形質転換次世 代における母入遺伝子の発 現(品種:朝の光) 38 21:

_ •	2	大学		次世代图体数		
-		17. 17.	トモログトル	ロマイシン抵抗性	CLS発現	E SE
	DP	±₩	抵抗性	格受性	整	<u>જ</u>
_	本版	1	0	88	0	ล
_	-2	~	ଞ	0	6	-
~	I	*2	3	83	22	22
-	-2	~	33	_	61	-

*2 コピーの導入遺伝子のうち1つのは制限断片が 短く、導入遺伝子は不完全。

サザン解析による形質転換 体における導入遺伝子のコ アー数および形質配換次世 代における導入遺伝子の発 現(品種:月の光) £30

į	以		次世代图体数		
√ M E	京子が	ハイグロマイジン	「シン抵抗性	38	競
ŧ	故	抵抗性	路受性	滋	数数
臣女	ı	0	8	0	8
_	_	87	83	22	ß
ধ	2	ន	8 2	13	ß
æ	2	ಜ	6	12	ശ
က	2	g	2	18	m
4	က	83	22	2	-
\$	6	8	=	91	က
٤		8	2	12	۰

							~	•										₹									
	锁	数数	ន	2	Ŋ	က	8	1	က	8	en	~	ı	r.	1	~	ı	2	9	ß	7	ß	2	œ	2	8	-
	CLESSER!	뿚	0	22	13	12	18	23	91	11	11	11	ı	ī	1	81	ı	81	=	15	13	12	2	21	15	=	13
次世代图体数	、シン低抗性	路受性	88	83	81	6	2	23	=	13	7	6	13	æ	83	82	2	19	7	œ	∞	8	7	2	2	•	8
	11/1071	抵抗性		2	ន	ಣ	ह्य	81	æ	83	8	ষ	47	88	ð.	B	ន	Ю	2	ន	83	22	8	83	8	æ	88
松	以 で は は	쁄	ı	_	~	~	~	e	6	က	က	က	2	-	4	-	4	~	m	~	~	-	_	~	~	~	2
1	7.00E	t t	買	_	ধ	ধ	က	3	\$	ß	d3	ĸ	9	-	•	6	2	=	21	怒	슖	2	₹	15	2	霯	180

100	大型		大世代個体数		
Ó.P.E	4 4 1 1 1 1	ハイグロマイシン抵抗	ンン抵抗性	Sy	CLS SETT
t	は数	抵抗性	級受性	開作	쇞
17	9	88	41	1	1
18a*	-	ĸ	S	15	<u>م</u> ا
叠	-	8	ន	21	2
62	2	43	22	1	1

本 次世代についてサザン法による導入遺伝子の分 析を行った。

10

(1) トクキロコツ品種

トウモロコシ品種A188,F1 (A188x Black Mexican Swe et) ,F1 (A188x B73/tt) ,F1 (B73/tt x A188) ,F1 P3732 を材料として選定した。A188,Black Mexican Sweet,B73 用のいずれの名品権は媒林水産省生物資源研究所から、 また、P3732は啓田館農協同組合から各々入手した。

(2) 生長点近傍組織の調製

ナトリウムに5分間浸消した。 破菌水で3回洗浄後、LS 100-127、100mg//カザミノ酸、700mg//プロリン、20g/ 下で4日間培養後、発芽した幼苗から頂端分裂組織を含 ン類;Linsmaier,E.and Skoog,F.1965;Physiol.Plant18; 完整菓子を70%エタノールに1分間、1%次亜塩素的 Iショ暦、2.3g/Iゲルライト)に囮床した。25℃、暗黒 む約0.1×0.3mの超額を切り出し以下の実験に供試し 固体結婚(Linsmaier and Skoogの無極塩およびピタミ 20

(3) 未熱胚由来カルスの調整

ロリン、1.5mg// 2,4-D、20g//ショ樹、2.3g//ゲルラ イト)に固味した。3週間培養後、形成された胚盤由来 機塩およびピタミン類、100mg/1カザミノ酸、700mg/1ブ 未熟版をLSD1.5固体结甾(Linsmaier and Skoogの無 カルスを以下の実験に供試した。

(4) アグロバクテリウムの関系

実施例 1 に示したアグロバクテリウムの箇系のうち、 LBA4404 (pTU/C32) およびEHA101 (pIC1211h) を用い

(5) アグロバクテリウム観燈液の調整

た体正AA倍地に懸濁し、筃浪度を3~5×10°細胞/m1に リウムのコロニーを白金耳でかきとり、実施例1に示し くイグロレイシン (SOmg/L) となナレイシン (SOmg/ 1)を含むAd倍地上で3~10日間倍換したアグロバクテ 質数しお程に用いた。

(6) 生長点近傍相橋への接種、培養条件

切り出した組織をガラス針で穿刺後、上述のアグロバ 数抽腔、Murashige and Skoogのアタミン街;Murashige クテリウム懸濁液に3~10分間没漬した。没資処理後、 100μMアセトシリンゴン、20qハショ森、10qハグルコ ースを含む修正に固体培地 (Linsmaier and Skoogの無 S

Ê

.and Skoog, F. 1962; Physiol. Plant. 15:473-497, 0.1m

ト) Cを値し、25C、原明下で2~3日間塩穀した。 そ

g//カイネチン、1.0kg//カザミノ酸、2.3g//ゲルライ の後、250mg/1セフォタキシムを含む城樹木で洗浄し、 同議度のセフォタキシムを含むLS国体培地で培養を続け

特許2648287 24

実験	供試和 複数	差項の伸及 した組織数	問られた 植物体数	GIS発現のみられた相切体数	
8	25	И	8	0	
2	8	7	_	0	

供知品権はいずれもP3732

(10) トウモロコシの品種ねよび供試箇系による遺伝子 導人効率の違い

固体培地に移植し、25℃、暗黒下で3日間共存培養をお

没法後、実施例1に示したアセトシリンゴンを含む2NG Cなった。その後カルスを250mg/1セフォタキシムを含

カルスを前述のアグロバクテリウム壁溜液に約5分間

(1) カルスへの接種、培養条件

む滅菌木で洗浄し、間濃度のセフォタキシムおよび30mg

ハハイグロマイシンを含むLSD1.S固体培地で培養を続

け、系質転換カルスの選抜を行った。

(8) CUSS指性の調査方法

登を継続した茎頂組織およびカルスについて実施例1の

方法にもとづきGIS古性を調査した。

(9) 塞頂組織への遺伝子導入

とした形質転換が可能である事を確認するため、前述の アグロバクテリウム菌系EHAJO1(pIG121hh)を単艦した

Could5の報告 (Could).,ct al.1991;Plant Physio .95:426-434) による生長点組織(塞頂組織)を材料 した。アグロバクテリウム非処理の組織では、いずれも

茎頂組織に処理し、生長した植物体でのGISS古性を調査 Qus遺伝子の発現はみられなかったが、アグロバクテリ ウム処理した組織では針で穿刺した部分にGNS遺伝子の

共存培整処理直後の塞頂組織ねよびカルス、その後培

された。供試したアグロバクテリウムのパイナリベクタ (表10)。処理カルス化対するars株色部位の大きさも1 ーpICI21hatsよびpTCIC32はCUS造伝子中にヒッのイント ロンが介在しているため、アグロバクテリウムの植物の 供試したいずれの品種でも高知度でGK遺伝子の発現 がみられた。EIM101 (pIG1211th) 、LBA4404 (pT0K232) 9%以上のものが多く、 内部国の首数か道兄子弟以が示 中ではCINAICHを発現しない。このことから、トクモ の選系国での遺伝子免現効率の並は認められなかった ロコシのカルスにおいて認められたQS遺伝子の発現

は、アグロバクテリウムにより高頻度で遺伝子導人が行 われたことを示すものである。共存培発後、ハイグロマ イシンを含む固体培地上で培養することにより、供試力 資素被笛쩘かもろとおえられる。 これらのコンパクトか E.and Lusardi,M.C.1988;Maydica XXXIII:163-177) (C 物強した細胞はas通位子の発現を示したことから、形 ラスの一部カコンスクトれてを状のカルメが基础した。 C &状の形質転換カルスはLupottoSの方法 (Lupotto, より再分化可能である。 2

校11 トウモロコシカルスへの DIS遺伝子の導入効率

웄

発現を示すものは全くなかった。生長点近傍は非常に微

続けた植物体でGLS活性を調査したところ、GLS遺伝子の 細な組織であり、そこに穿刺しアグロバクテリウムを感 なさせることは容易でない。 本実験の結果から生長点近 切り出し、穿刺などに熱燎した技術が必要であると考え

発現が小さな点状に認められた。しかし、その後培養を

待へのアグロバクテリウムによる形質転換には生長点の

表10 トウモロコン基頂組 機への遺伝子導入 むった 施を存践

	品種	母妹	商体 GLS・のカルス数/処理カルス数 (%)
	A188	-	32/35(91)
	881W	_	34/34(100)
	A188~845	-	41/49(84)
	A1889873	_	35/42(83)
	98IV	2	33/40(98)
	881V	2	40/40(100)
	A188×8us	2	38/40(95)
40	A188×873	8	31/40(78)
	B73×4188	7	29/35(83)

GIS配現のみられた植物体数

対面の存成した。

本なる

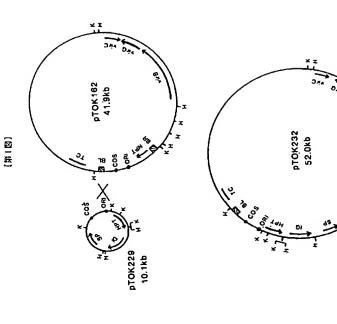
₹ \$

က

BMS: Black Mexican Sweet

图系1:EIA101(p1G121fm),2:LBA4404(pT0K222)





ンロントページの数や

(56)参兆文权

第 国際公開91/207 (WO, A 1) 国際公開92/969 (WO, A 1) B I O/TECHNOLOGY, 8 (1990) P. 33-38 Proc. Natl. Acad. Sc i. USA, 88 (1991) P. 10426-10430

Plant Cell Report s, 8 (1990) P. 303-306 資權, 44 [別1] (1994) P. 52